

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/12, 39/285 // C12N 15/37 C12N 15/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 90/10459 (43) Date de publication internationale: 20 septembre 1990 (20.09.90)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR90/00151 (22) Date de dépôt international: 6 mars 1990 (06.03.90) (30) Données relatives à la priorité: 89/02897 6 mars 1989 (06.03.89) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANS- GENE S.A. [FR/FR]; 16, rue Henri-Régault, F-92400 Courbevoie (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : MENEGUZZI, Guerrino [FR/FR]; Villa Bagatelle, Avenue Ste-Colette, F-06100 Nice (FR). LATHE, Richard [FR/FR]; 82, rue des Jésuites, F-67100 Strasbourg (FR). KIENY Marie- Paule [FR/FR]; 11, rue de Gascogne, F-67100 Stras- bourg (FR).	(74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR). (81) Etats désignés: AT (brevet européen), BE (brevet euro- péen), CA, CH (brevet européen), DE (brevet européen), DK (brevet européen), ES (brevet européen), FR (brevet européen), GB (brevet européen), IT (brevet européen), JP, LU (brevet européen), NL (brevet européen), SE (brevet européen), US. Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION USEFUL IN THE PREVENTION OR TREATMENT OF PAPILLOMA- VIRUS-INDUCED TUMOURS (54) Titre: COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, UTILE A TITRE PREVENTIF OU CURATIF CONTRE LES TU- MEURS INDUITES PAR LES PAPILLOMAVIRUS (57) Abstract The invention concerns the use in a pharmaceutical composition for the prevention and treatment of papillomavirus-in- duced tumours, in particular the HPV-16 virus, of a recombinant poxvirus comprising an heterologous DNA sequence coding at least for the essential region of a non-structural papillomavirus protein as well as the regulation elements ensuring its expression in the higher cells. More particularly, it concerns the E5, E6, E7 proteins of the HPV-16 virus. (57) Abrégé L'invention concerne l'utilisation, dans une composition pharmaceutique destinée à la prévention et au traitement des tu- meurs induites par les papillomavirus, en particulier le virus HPV-16, d'un poxvirus recombinant comportant une séquence d'ADN hétérologue codant au moins pour la région essentielle d'une protéine non structurale d'un papillomavirus ainsi que les éléments de régulation assurant son expression dans les cellules supérieures. Plus particulièrement, il s'agit des protéines E5, E6, E7 du virus HPV-16.		

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	ES	Spain	MG	Madagascar
AU	Australia	FI	Finland	ML	Mali
BB	Barbados	FR	France	MR	Mauritania
BE	Belgium	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	United Kingdom	NL	Netherlands
BG	Bulgaria	HU	Hungary	NO	Norway
BJ	Benin	IT	Italy	RO	Romania
BR	Brazil	JP	Japan	SD	Sudan
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SE	Sweden
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SN	Senegal
CG	Congo	LI	Liechtenstein	SU	Soviet Union
CH	Switzerland	LK	Sri Lanka	TD	Chad
CM	Cameroon	LJ	Luxembourg	TG	Togo
DE	Germany, Federal Republic of	MC	Monaco	US	United States of America
DK	Denmark				

-1-

COMPOSITION PHARMACEUTIQUE, UTILE A TITRE PREVENTIF OU CURATIF CONTRE LES
TUMEURS INDUITES PAR LES PAPILLOMAVIRUS

La présente invention concerne de nouvelles compositions vaccinales utiles contre les tumeurs induites par les papillomavirus, et plus particulièrement contre les types HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35,

5 Les papillomavirus représentant un groupe de virus à ADN. Ils possèdent une coque protéique et un génome d'ADN circulaire d'environ 7900 paires de bases. Un certain nombre de types de papillomavirus, bovins (BPV), humains (HPV) ont été identifiés, et les génomes
10 de certains ont été complètement séquencés (1).

Les travaux de recherche fondamentale qui ont été menés sur ces virus ont ainsi conduit à distinguer dans leur génome une région précoce et une région tardive, par analogie avec le génome du virus du polyome et du SV40.
15 La région tardive contient deux cadres de lecture L1 et L2 qui codent pour les composants majeurs de la capside. La région précoce contient au moins les cadres de lecture E1, E2, E4, E5, E6, E7 et E8. Les protéines codées par ces cadres de lecture possèdent des fonctions
20 différentes. Trois de ces protéines sont impliquées dans les processus de transformation oncogénique des cellules infectées. La protéine E5 de BPV-1 qui possède un important pouvoir de transformation et qui peut in vitro transformer des cellules de façon indépendante (2) est
25 codée par la partie 3' de la région précoce. Les protéines E6 de BPV-1 et E7 de HPV-16 sont codées par la partie 5' de la région précoce et sont impliquées dans l'induction et le maintien de la transformation oncogène. Ces deux protéines semblent dériver d'un gène ancestral
30 commun par duplications successives d'un peptide de 33 acides aminés (3). Le pouvoir transformant de E7 a été démontré pour HPV-16 et 18 (4, 5, 6). Parmi les autres protéines précoces, E1 et E2 possèdent un rôle dans la

2

replication et/ou l'expression du virus alors qu'il n'a pas été mis en évidence de fonction à E4 et E8.

Chez l'homme, les HPV sont associés à des pathologies allant de l'infection bénigne de la peau, aux verrues et aux tumeurs malignes. Ces virus sont hautement spécifiques des tissus cibles, notamment les épithéliums de l'épiderme des voies génitales, orales et respiratoires (7). Les données épidémiologiques suggèrent fortement le rôle de certaines souches d'HPV dans le cancer du col de l'utérus et des voies basses (tumeur le plus fréquemment fatal chez la femme). L'ADN de HPV-16 et HPV-18 est retrouvée dans la plupart des biopsies provenant de cellules cancéreuses génitales, plus rarement on détecte HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39 et HPV-45.

Les pathologies associées aux virus HPV posent un problème thérapeutique du fait de leur nature persistante et récurrente. De nombreuses approches ont déjà été utilisées dans le traitement de ces maladies : la chirurgie, la chimiothérapie, les agents antiviraux et l'immunothérapie (8).

En particulier, la publication européenne de brevet EP-A-0133123 décrit une approche de vaccination contre une infection par les papillomavirus qui consiste à préparer par génie génétique des protéines de la capside du virus, c'est-à-dire des protéines de structure correspondant donc à la région tardive du virus, et à les utiliser comme agents immunogènes. Dans ce document, les moyens décrits visent à une protection contre une infection par les virus eux-mêmes, et donc a priori contre toutes les formes d'infections susceptibles de se développer.

3

La présente invention vise plus précisément l'obtention de vaccins actifs, à titre préventif ou curatif contre les tumeurs malignes résultant d'une infection préalable par HPV.

5

La présente invention repose sur l'observation que la formation des tumeurs induites par les papillomavirus est due à l'expression des gènes précoces des virus.

10

L'invention a donc pour objet des compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles contiennent à titre de principe actif préventif ou curatif au moins un poxvirus recombinant qui comporte une séquence d'ADN
15 hétérologue codant au moins pour la région essentielle d'une protéine précoce d'un papillomavirus ainsi que les éléments de régulation assurant son expression dans les cellules supérieures.

20

Par région essentielle de ladite protéine, on entend désigner la partie de la séquence protéique capable d'induire une immunité antitumorale.

Les compositions vaccinales selon l'invention
25 peuvent être utilisées à des fins variées. Elles peuvent être utilisées à titre préventif, pour empêcher l'apparition de tumeurs malignes, soit avant toute infection par le virus, soit encore après une infection ayant causé des troubles bénins, par crainte de voir
30 d'autres tissus atteints et se transformer en tissus cancéreux. Elles peuvent potentiellement être aussi utilisées à titre curatif, pour faire disparaître une tumeur déjà installée, ou en complément ou substitution à une ablation. Ces utilisations peuvent concerner l'homme,
35 mais aussi l'animal, en particulier les bovins pour la prévention des infections par le virus BPV. On pourra

FEUILLE DE REMPLACEMENT

4

utiliser, le cas échéant le poxvirus recombinant avec un support pharmaceutiquement acceptable pour son inoculation à l'homme ou à l'animal.

- 5 Etant données les observations qui ont été faites, et rappelées plus haut sur la fréquence d'infection par HPV de type 16-18-31-33-35-39 et 45 dans les cas de cancer du col de l'utérus, l'invention concerne plus particulièrement des compositions
10 vaccinales utiles contre HPV-16, HPV-18, HPV31, HPV33, HPV-35, HPV-39 et HPV-45.

C'est pourquoi l'invention a pour objet une composition vaccinale telle que définie précédemment dans
15 laquelle le poxvirus comprend au moins une séquence d'ADN codant pour au moins une protéine non-structurale du virus HPV de type 16, 18, 31, 33, 35, 39 ou 45 et en particulier du virus HPV-16.

- 20 Comme rappelé précédemment, la structure des virus de la famille des papillomes, en particulier BPV-1 et HVP, est telle qu'il existe au moins 7 cadres de lectures susceptibles de correspondre à des fonctions protéiques bien spécifiques des mécanismes d'action du
25 virus et du maintien du génome viral. C'est pourquoi il peut être intéressant de préparer des compositions pharmaceutiques qui expriment dans l'organisme humain plusieurs protéines simultanément. Ceci peut être obtenu soit avec plusieurs poxvirus exprimant chacun une
30 protéine donnée, soit avec un poxvirus contenant plusieurs séquences d'ADN hétérologue correspondant aux protéines choisies.

Bien entendu, le poxvirus recombinant comportera
35 l'ensemble des éléments nécessaires à l'expression des protéines dans les cellules supérieures, c.à.d. généra-

5

lement un promoteur de la transcription du gène et une région d'initiation de la traduction dans la cellule hôte ; de préférence le promoteur sera le promoteur d'un gène du poxvirus utilisé.

5

Parmi tous les poxvirus envisageables, on choisit de préférence le virus de la vaccine, car il a déjà été établi que les antigènes exprimés par le virus de la vaccine recombinant sont correctement présentés à la surface des cellules infectées et permettent l'induction d'une réponse immunitaire de type cellulaire. Ces circonstances sont donc particulièrement favorables puisqu'il est connu que l'élimination des cellules tumorales implique l'immunité cellulaire.

15

Lorsque le poxvirus est le virus de la vaccine, on utilisera de préférence comme promoteur celui du gène de la protéine 7,5 K du virus de la vaccine. L'ensemble promoteur-séquence codant sera inséré dans une région non essentielle du virus ; par exemple, dans le cas du virus de la vaccine, le gène de la thymidine kinase (TK) ce qui permettra une sélection aisée des virus recombinants TK⁻.

Généralement, le virus vivant est inoculé à l'homme ou à l'animal. Toutefois, on peut aussi envisager d'injecter à l'homme ou à l'animal le virus recombinant tué, présentant à sa surface les protéines choisies, ou les protéines purifiées à partir de cultures cellulaires infectées par les virus de la vaccine recombinants.

30

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être préparées selon des procédés connus dans le domaine des vaccins, et les doses applicables pourront varier dans une large gamme. Elles seront fonction notamment de l'état du patient et d'autres paramètres qui seront évalués par le praticien.

6

L'invention sera illustrée par les exemples ci-après, qui décrivent d'une part des résultats de vaccination sur animaux auxquels on a injecté des cellules transformées par le virus du papillome bovin (BPV-1) et, d'autre part, des résultats de vaccination sur animaux auxquels on a injecté des cellules transformées par le virus du papillome humain (HPV-16). On décrit en particulier le clonage et le séquençage des ADN correspondant aux cadres de lecture aux protéines E5, E6, E7 de HPV-16 ainsi que les résultats de vaccination obtenus avec des virus recombinants exprimant ces protéines.

La description détaillée de l'invention sera accompagnée par les figures 1 à 7 qui représentent :

- la figure 1 représente le gel SDS-PAGE des immunoprécipités des produits des cadres de lecture E1, E2, E5 et E6 de la région précoce du génome du papillomavirus bovin BPV-1.
- la figure 2 représente la période de latence du développement des tumeurs des animaux vaccinés avec les virus de la vaccine recombinants, exprimant les produits des cadres de lecture E1, E2, E5, E6 ou E7 du papillomavirus bovin BPV-1 (VVbE1, VVbE2, VVbE5, VVbE6 et VVbE7), ou un virus de la vaccine recombinant témoin, VV-0 (n'exprimant pas une protéine de BPV-1) et éprouvés avec des cellules FR3T3 transformées par BPV-1 (FR3T3 BPV-1-6).
- la figure 3 représente la période de latence du développement des tumeurs chez des animaux vaccinés avec les virus de la vaccine recombinants exprimant les produits des cadres

de lecture E5, E6 et E7 du papillomavirus bovin BPV-1 (VVbE5, VVbE6, VVbE7) ou une association VVbE5-VVbE6 ou VVbE5-VVbE7 ou un virus de la
5 vaccine recombinant témoin VV-0 (n'exprimant pas une protéine de BPV-1) et éprouvés avec des cellules FR3T3 transformées par BPV-1 (FR3T3-BPV-1-3).

10 - la figure 4 représente schématiquement la structure du bactériophage M13 E7/E6 (HPV-16).

- la figure 5 représente schématiquement la structure du bactériophage M13 E5 (HPV-16).

15 - la figure 6 représente la séquence de l'ADN complémentaire du cadre de lecture E5 (HPV-16).

20 - la figure 7 représente le gel SDS-PAGE des immunoprécipités des produits des cadres de lecture E6 et E7 de la région précoce du génome du papillomavirus humain HPV-16.

25 - la figure 8 représente l'évolution de la taille des tumeurs chez des animaux vaccinés avec le virus de la vaccine recombinant exprimant le produit du cadre de lecture E6 du papillomavirus humain HPV-16 (VVhE6) et éprouvés avec des cellules primaires de rat transformées par HPV-16 et un oncogène ras.

30 - la figure 9 représente l'évolution de la taille des tumeurs chez des animaux vaccinés avec le virus de la vaccine recombinant exprimant le produit du cadre de lecture E7 du papillomavirus humain HPV-16 (VVhE7) et
35 éprouvés avec des cellules primaires de rat transformées par HPV-16 et un oncogène ras.

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Exemple 1 : Inhibition du développement des tumeurs induites par le virus du papillome bovin (BPV-1) par vaccination par des virus de la vaccine recombinants exprimant les protéines précoces de BPV-1.

a) Construction des virus de la vaccine exprimant les protéines précoces de BPV-1

Le plasmide pM69 (9) contient la région précoce du génome de BPV-1 inséré en tant que fragment HindIII-BamHI dans les sites HindIII et BamHI du plasmide pML2 (9). Des sous-fragments contenant les cadres de lecture E1, E2, E5, E6 et E7 sont excisés par digestion avec des enzymes de restriction (voir tableau I) et introduits dans les bactériophages M13TG130 ou M13TG131 (10) puis soumis à une mutagénèse localisée dirigée par oligonucléotide avant d'être transférés dans le plasmide pTG186 poly (11). Ces étapes sont récapitulées dans le tableau I.

Légende du tableau I :

- [a] : les nucléotides soulignés précisent les bases non apparues à la séquence parentale de BPV-1
- [b] : le codon d'initiation de la traduction et le site de restriction utilisés dans le clonage sont soulignés.
- [c] : il n'a pas été possible d'introduire le fragment EcoRI - BamHI du plasmide pM69 contenant le cadre de lecture E5 dans le bactériophage M13TG131 dans l'orientation désirée : les clones sont obtenus dans l'orientation inversée dans laquelle deux fragments de plasmides indépendants sont clonés ; la mutagénèse par oligonucléotide correspond donc à l'autre brin de l'ADN.

[k] : extrémité produite par digestion par une enzyme de restriction puis traitement avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase I de E. coli avant le clonage ;
na : non applicable.

5

Tableau I : Clonage et mutagénèse des sous-fragments du génome de BPV-1 pour leur transfert dans les virus de la vaccine.

10

BPV-1		Mutagénèse	Clonage
• cadre de lecture	• vecteur	• séquence (5'-3') des oligonucléotides utilisés [a]	• fragment
• fragment	• site	• séquences au site d'initiation de la traduction [b]	• vecteur
			• site
15			
E1	M13TG130	na	<u>BamHI-SstI</u>
20	<u>NruI-AvrII</u>	<u>BamHI[k]-XbaI</u>	pTG186poly
		(TCGCGAGCGTCATGG)	<u>BamHI-SstI</u>
E2	M13TG131	GAGGAGGATCCTGAAGAGGA	<u>BamHI</u>
<u>EcoRI-SpeI</u>	<u>EcoRI-XbaI</u>	(GGATCCTGAAGAGGATGG)	pTG186poly
25			<u>BamHI</u>
E5	M13TG131	AGATTTGCCATAGTCGACCAGTCA[c]	<u>SalI-BamHI</u>
<u>EcoRI-BamHI</u>	<u>EcoRI-BamHI</u>	(GTCGACTATGG)	pTG186poly
30			<u>SalI-BamHI</u>
E6	M13TG130	CAGACCCCGGATCCAACATGGACCT	<u>BamHI-XmaIII[k]</u>
<u>HpaI-SmaI</u>	<u>SmaI</u>	(GGATCCAACATGG)	pTG186poly
			<u>BamHI-SmaI</u>
35			
E7	M13TG130	TGCTACGACTCGAGCAAACATGGTTCA	<u>XhoI-EcoRI</u>
<u>HpaI-SmaI</u>	<u>SmaI</u>	(CTCGAGCAAACATCG)	pTG186poly,
			<u>SalI-EcoRI</u>

La mutagenèse localisée dirigée par oligonucléotide permet d'introduire une séquence consensus de l'initiation de la traduction au niveau du codon d'initiation de manière à assurer l'expression
5 correcte après transfert dans le virus de la vaccine. Dans chaque cas, l'oligonucléotide de synthèse introduit un site de restriction unique juste avant la séquence déterminant le début de la traduction.

10 Dans le cas du cadre de lecture de E1, il n'est pas nécessaire de faire de mutagenèse localisée du fait de la présence d'un site de restriction dans le génome de BPV-1 (site NruI en position -11 par rapport à l'ATG initiateur et d'une séquence quasi consensus de la région
15 d'initiation de la traduction (CCGTCATGG) : le nucléotide G en position -3 est presque aussi efficace que A dans l'initiation de la traduction.

Des cellules primaires d'embryon de poulet sont
20 cultivées à 37°C dans un milieu MEM (Gibco) supplémenté avec 10 % de sérum de veau foetal. Elles sont simultanément soumises à une infection par un virus de la vaccine thermosensible et à une transfection par les vecteurs d'expression/transfert portant les segments
25 insérés de BPV-1 et par l'ADN du virus de la vaccine type sauvage. Après sélection, on isole selon les techniques courantes, des recombinants de la vaccine dans lesquels l'expression de la séquence insérée est sous le contrôle du promoteur 7.5 K du virus de la vaccine.

30

Les virus de la vaccine recombinants (VV) exprimant les protéines précoces de BPV-1 E1, E2, E5, E6 et E7 sont appelés respectivement VVbE1, VVbE2, VVbE5, VVbE6 et VVbE7.

b) Expression de E1, E2, E5, E6 et E7 dans les cellules infectées par les virus recombinants

Des cellules BHK-21 sur milieu de Eagle modifié
5 par Dulbecco MEM.BME (GIBCO) supplémenté avec 10 % de
sérum de veau foetal (GIBCO) sont infectées avec l'un des
six virus recombinants avec une multiplicité
d'approximativement 20 unités formant plaque (ufp) par
cellule.

10

Après une heure à 37°C, du milieu frais est
ajouté et les cellules sont incubées pendant deux heures.
Le milieu est retiré, les cellules lavées une fois. Du
milieu MEM.BME sans méthionine et/ou cystéine et
15 supplémenté avec 5 % de sérum de veau foetal dialysé est
alors ajouté. Le marquage est effectué avec 0.5-1 mCi/ml
de L-méthionine-35S et/ou L-cystéine-35S (Amersham)
pendant 3 heures à 37°C. Les cellules ainsi marquées sont
rincées deux fois avec 20 mM Tris. HCl pH 7,2 ; 150 mM
20 NaCl (tampon TS) contenant de l'aprotinine (1 UI/ml ;
Biosys, France), collectées par grattage et rincées par 2
centrifugations dans du tampon STE (20 mM Tris. HCl pH
7,2 ; 150 mM NaCl ; 1 mM Na₂EDTA ; 1 % aprotinine). Les
cellules sont lysées dans du tampon RIPA [50 mM Tris. HCl ;
25 pH 7,4 ; 150 mM NaCl ; 1 mM Na₂EDTA ; 1 % Triton X-100 ;
1 % NaDeoxycholate ; 0,1 % SDS] ou fractionnées pour
déterminer la localisation subcellulaire des protéines de
SPV-1.

30

L'immunoprécipitation et le SDS-PAGE sont
effectués suivant la procédure décrite par Davis (12).
Des antisera polyclonaux de lapins, dressés contre les
protéines de fusion bactériennes correspondant aux cadres
de lecture E1, E2, E5, E6 et E7 sont obtenus par la
35 méthode classique connue de l'homme du métier, voir par
exemple les références (13) et (14).

Les cellules infectées avec VVbE1 produisent une protéine nucléaire de 69kD qui est spécifiquement reconnue par l'antisérum anti-E1 (fig. 1, bande 1, la bande 2 correspond à une immunprécipitation avec un sérum non immun). Les cellules infectées par VVbE2 contiennent un niveau élevé d'un polypeptide de 48 kD présentant une réactivité croisée avec E2 et correspondant à la protéine de transactivation majeure codée par le cadre de lecture E2 de BPV-1 (fig. 1, bande 3 et contrôle, bande 4). Ce polypeptide est détecté dans toutes les sous-fractions cellulaires examinées, conformément à ce qui a été décrit pour la protéine E2 de cellules transformées par BPV-1 (15). VVbE6 code pour une protéine de 15,5 kD spécifiquement précipitée par le sérum anti E6 (fig. 1, bande 6 et contrôle bande 7) et localisée à plus de 50 % dans la fraction cytoplasmique comme pour la protéine E6 des cellules transformées par BPV-1 (16). Les cellules infectées par VVbE5 produisent un polypeptide de 7,5 kD associé aux membranes cellulaires (fig. 1, bande 7 et contrôle, bande 8), localisation caractéristique de la protéine E5 de BPV-1 (17). Les expériences d'immunoprécipitation avec l'antisérum anti-E7 ne présentent pas de réactivité croisée. Néanmoins, l'analyse des vecteurs d'expression révèle la présence du cadre de lecture de E7 dans une orientation correcte et nous supposons que E7 est effectivement produite mais que pour une raison inconnue elle n'est pas précipitée par l'antisérum disponible.

30 c) Vaccination contre les cellules tumorales induites par BPV-1

Des groupes de rats femelles (Fischer) âgées de 4 semaines sont inoculées par voie intradermale ou intrapéritonale avec les différents virus recombinants

(à une dose de 10^8 ufp dans 100 μ l). Ils subissent une injection de rappel avec la même dose après 12 jours et sont soumis à une inoculation d'épreuve, entre le 16e et le 17e jour avec des cellules 3T3 de lignées syngéniques de rats Fischer (FR3T3) transformées par BPV-1 selon le protocole décrit dans les références (9, 18) et appelées FR3T3-BPV-1-6. Pour ceci, 2×10^4 cellules sont injectées par voie sous-cutanée dans un volume de 200 μ l de milieu MEM.BME sans sérum.

10

Les résultats sont représentés sur la figure 2 :

- tous les animaux contrôlés, vaccinés avec VV-0 développent des tumeurs après une période de latence de 43 jours en moyenne.
- les animaux vaccinés avec VVbE1 ou VVbE2 ne présentent pas de modification dans le développement des tumeurs.
- les animaux vaccinés avec VVbE5, VVbE6 et VVbE7 présentent un retard significatif de l'apparition des tumeurs. De plus dans quelques cas, il n'y a pas de développement de tumeurs (> 250 jours après l'épreuve), points représentés dans le cadre en haut de la figure.

20

25

Ces expériences sont répétées en effectuant l'inoculation d'épreuve avec des cellules de la lignée FR3T3 transformées par BPV-1 selon le protocole décrit dans les références (9, 18) et appelées FR3T3-BPV-1-3. VVbE1 et VVbE2 étant sans effet, seuls VVbE5, E6 et E7 sont testés et deux groupes de rats sont inoculés avec 2 virus recombinants simultanément, soit VVbE5 et VVbE7 soit VVbE5 et VVbE6 afin de mettre en évidence un éventuel effet cumulatif de ces antigènes. La figure 3

30

35

confirme l'effet bénéfique d'une vaccination par VVbE5 et VVbE7 (les points dans le cadre du haut de la figure correspond aux animaux qui ne développent pas de tumeur) alors que VVbE6 reste sans effet notable dans cette situation. De plus il n'apparaît pas d'effet cumulatif marqué lors de l'association VVbE5, VVbE7.

Exemple 2 : Clonage du génome du virus HPV-16.

Les cellules de la lignée CaSki (ATCC 1550) contiennent le génome du virus HPV-16 intégré dans un chromosome. A partir de 10 fioles de 75 cm³ de cellules CaSki semi-confluences, l'ADN génomique total est purifié de la façon suivante : les cellules sont récupérées par grattage, centrifugées et lavées puis reprises dans 15 ml de tampon TE [Tris 10 mM pH 7,5 ; EDTA 1 mM] + 0,5 % SDS. Après traitement à la protéinase K (7,5 mg/15 ml) à 37°C pendant 16 heures, l'ADN est stocké à 4°C. De cette façon, 1 ml de solution contenant 0,6 mg d'ADN est obtenu.

70 µg de cet ADN sont soumis à une digestion partielle par l'enzyme MboI (10 min. ; 40 unités) puis déposés sur un gradient linéaire (20 % - 40 %) de sucrose. Après centrifugation (rotor SW28, 16 heures à 25.000 r, 20°C), des fractions de 500 µl sont collectées. Les fractions contenant de l'ADN de taille comprise entre 10 et 20 kb (fraction 23-26) sont réunies, dialysées contre du tampon TE, puis précipitées à l'éthanol. De cette façon, 5 µg d'ADN sont obtenus.

Afin de disposer d'un vecteur de clonage pour l'ADN décrit précédemment, l'ADN du bactériophage lambda EMBL 301 (19) est digéré par l'enzyme de restriction BamHI. Après extraction au phénol-chloroforme et précipitation à l'éthanol, l'ADN est resuspendu dans du tampon TE.

L'ADN génomique des cellules CaSki et l'ADN du bactériophage lambda sont ensuite ligués selon un protocole classique (1 µg de vecteur, 2 µg d'ADN génomique). Après empaquetage de l'ADN grâce à une
5 trousses commercialisée par Amersham, un total de $0,75 \times 10^6$ clones indépendants est obtenu. Ces bactériophages sont étalés avec des bactéries E. coli Q358 sur 18 boîtes de 14 cm de diamètre et sur milieu LBM afin d'être criblés avec des oligonucléotides
10 synthétiques déduits de la séquence du virus HVP-16 [(EMBL) PA16].

Le criblage de l'ADN des bactériophages recombinants est effectué de façon classique pour l'homme
15 de métier. Les oligonucléotides 1817 (séquence 5' CATGCATGGAGATACACCTACATTG 3' ; cadre de lecture E7' et 1818 (séquence 5' GTGGATAACAGCAGCCTCTGCGTTT 3' ; cadre de lecture E5) marqués radioactivement au ^{32}P , sont mélangés et hybridés à l'ADN phagique (transféré sur des filtres
20 de nitrocellulose) pendant 16 heures à 55°C dans un tampon SSC concentré 6 fois. Les filtres sont ensuite lavés dans les mêmes conditions de stringence, 10 signaux positifs (1-10) ont été obtenus. La zone des boîtes de pétri correspondant à ces signaux est reprise dans 1 ml
25 de tampon LBM. Ces suspensions sont réétalées sur des boîtes de pétri Ø 10 cm (2-10 µl de suspension par boîte) en double et un criblage secondaire est effectué avec les oligonucléotides 1817 et 1818 séparément. Les signaux correspondant aux phages obtenus à partir des premiers
30 isollements 4 et 5 étant les plus intenses, ces deux clones sont choisis pour la suite des expériences.

Des minicultures de bactéries E. coli Q358 infectées avec le bactériophage, isolé à partir des
35 sous-clones 4-1, 4-2, 5-1 et 5-2 sont réalisées. L'ADN de

ces clones est purifié et soumis à digestion par l'enzyme de restriction PstI afin d'analyser les recombinants sélectionnés.

5 Après migration sur un gel d'agarose 1 %, les ADN ci-dessus sont transférés sur une membrane de nitrocellulose selon la technique de Southern. Ces membranes sont ensuite incubées avec les deux oligonucléotides 1817 et 1818 marqués au ^{32}P par action
10 de la polynucléotide kinase comme précédemment. Après hybridation et lavage de la membrane, cette dernière est soumise à autoradiographie. Deux bandes correspondant à des ADN de tailles 1063 et 1772 pb respectivement sont
15 révélées ainsi, indiquant que les clones 4-1, 4-2, 5-1 et 5-2 possèdent le génome du virus HPV-16.

Exemple 3 : Séquençage des ADN correspondant à E6, E7 et E5

20 Le bactériophage 5-1 est choisi pour les expériences ultérieures. Afin de disposer de quantités importantes de l'ADN de ce clone une préparation d'ADN à partir de 500 ml de bactérie E. coli Q358 infectées est réalisée selon un protocole classique. 800 µg d'ADN sont
25 ainsi obtenus. Après digestion par l'enzyme PstI, l'ADN est soumis à l'électrophorèse sur gel d'agarose 1 % contenant du bromure d'éthidium et visualisé sur une lampe UV. Les bandes de gel correspondant aux tailles 1063 et 1772 pbs sont découpées et l'ADN est extrait en
30 utilisant une trousse "Geneclean" (Biol01 Inc). Cet ADN est ensuite ligué dans un bactériophage M13TG130 ouvert au site PstI et transformé dans des bactéries compétentes E. coli NM522.

L'ADN des bactériophages M13 recombinant est purifié à partir de minicultures (1,5 ml) et analysé par digestion avec des enzymes de restriction. Un clone contenant la bande HPV-16 1063 pb (M13 E5) et un clone
5 contenant la bande HPV-16 1772 pb (M13 E7/E6) sont sélectionnés.

Afin de limiter le travail de séquençage et comme les ADN recherchés sont ceux correspondant aux cadres de
10 lecture E5, E6 et E7, seules les régions des fragments de restriction PstI correspondant aux protéines E6 et E7 (M13 E7/E6) et E5 (M13 E5) sont séquencées, grâce à des oligonucléotides synthétiques de séquence

15 5' ATCTAACATATATTC 3' et 5' GTTGTTCATACAAA 3' pour M13 E7/E6
et
5' GCTGCCTATTAATAC 3' pour M13 E5.

La figure 4 présente la structure du bactériophage M13
20 E7/E6 et la figure 5 celle du bactériophage M13 E5. La séquence obtenue pour E7 révèle une homologie totale avec la séquence contenue dans les banques de données PPH16. Pour E6 on observe deux mutations : G à la place de A en position +46 et G à la place de T en position +264 par
25 rapport à l'ATG initiateur de E6. Pour E5, on obtient la séquence représentée à la figure 6, qui diffère par quelques bases de la séquence contenue dans la banque de données.

30 Exemple 4 : Clonage des fragments d'ADN portant E6, E7 et E5 dans le vecteur de transfert.

Avant d'intégrer les ADN codant pour ces 3 cadres de lecture dans des virus de la vaccine recombinants, il
35 est nécessaire de les modifier afin de disposer de sites de restriction uniques en amont et en aval des gènes et

d'améliorer les séquences autour de l'ATG initiateur afin d'obtenir une bonne traduction et un niveau élevé de protéine synthétisée.

5 a) Cadre de lecture E6

Un site de restriction SalI et un site SphI sont créés respectivement en amont et en aval de la séquence codant pour E6 grâce à deux oligonucléotides synthétiques, en employant une technique de mutagenèse localisée dirigée par oligonucléotide (trousse Amersham). Ces deux mutations ponctuelles sont réalisées simultanément en utilisant les oligonucléotides suivants :

15

5' GTTAGTATAAAAGTCGACCCACCATGCACCAAAAGAG 3'

5' CATGCATGCAGATACACC 3'

20

Un nucléotide A en position -3 par rapport à l'ATG est introduit à la place d'un nucléotide T en même temps que le site Sal I.

Les bactériophages obtenus sont analysés par digestion avec des enzymes de restriction et par séquençage. Un clone est retenu pour la suite désigné M13TG1181. Le fragment de restriction SalI-SphI est ensuite cloné dans le vecteur pTG186 poly (11) ouvert aux sites SalI et SphI (pTG2198). Ce vecteur permet le transfert de l'ADN dans le génome du virus de la vaccine.

30

b) Cadre de lecture E7

35

Un site de restriction PstI et un nucléotide A en position -3 sont introduits en amont de la séquence

codant pour la protéine E7 par mutagenèse localisée grâce à l'oligonucléotide suivant :

5' GTAGAGAAACCCTGCAGCCACCATGCATGGAG 3'

5

Plusieurs clones ont été obtenus. L'un d'entre eux qui contient un fragment de restriction PstI de 350 pb, est séquencé dans la zone correspondant à la mutation. La séquence correspond bien à la mutation attendue (M13TG1182). Le fragment de restriction PstI est ensuite inséré dans le plasmide pTG186 poly ouvert au site PstI (pTG2199).

10

c) Cadre de lecture E5

15

Un site de restriction PstI est introduit en amont de l'ATG initiateur du cadre de lecture E5 (position 3851 dans PPH16) par mutagenèse localisée grâce à l'oligonucléotide suivant :

20

5' GTCTACTGCATTTACTGCAGTATGACAAATCTTGAT 3'

Un site de restriction EcoRI est introduit en aval du codon stop grâce à l'oligonucléotide suivant :

25

5' GTATATGTACATAATGAATTCTTACATATAATTGTTG 3'

30

Ces deux mutations sont introduites simultanément (trousse Amersham) . Le clone retenu pour la suite est désigné par M13TG 3151. Le fragment de restriction PstI-EcoRI est ensuite inséré dans le plasmide pTG186 poly ouvert aux sites PstI et EcoRI (pTG3180).

Exemple 5 : Construction des virus de la vaccine recombinants.

Les plasmides pTG2198, 2199 et 3180 sont
utilisés pour transférer les cadres de lecture E6, E7 et
5 E5 dans un virus de la vaccine (souche Copenhagen) comme
décrit précédemment. Les virus recombinants où les
séquences codantes sont sous le contrôle de promoteur
7,5 K de la vaccine sont appelés VVhE6, VVhE7 et VVhE5.

10 Des cellules BHK-21 sur milieu MEM.BME supplémenté
avec 10 % de serum de veau foetal sont infectées avec
l'un des trois virus recombinants avec une multiplicité
d'approximativement 20 ufp par cellule.

15 Après incubation suivant le protocole décrit
précédemment, les cellules sont récupérées, lysées et
fractionnées afin de déterminer la localisation
subcellulaire des protéines de HPV-16.

20 L'expression des gènes E6 et E7 est vérifiée par
immunoprécipitation des protéines (marquées à la
cystéine ³⁵S) synthétisées.

25 Les anticorps polyclonaux dressés contre les
protéines de fusion bactériennes correspondant aux cadres
de lecture de E6 et E7 sont obtenus par la méthode
classique connue de l'homme du métier et décrite dans les
références (20) et (21).

30 Les cellules infectées par VVhE6 produisent une
protéine cytoplasmique de 18 kD qui est spécifiquement
reconnue par l'antisérum anti-E6 (fig. 7, bande 1, la
bande 2 correspond à une immunoprécipitation avec un
sérum non immun). Les cellules infectées par VVhE7
35 produisent aussi une protéine cytoplasmique de 19-20 kDa
spécifiquement reconnue par l'antisérum anti-E7 (fig. 7,

bande 3, la bande 4 correspond à une immunoprécipitation avec un sérum non immun).

Pour E5, aucun antisérum n'étant disponible,
5 l'intégration du bloc d'expression de E5 dans le virus de la vaccine est vérifiée par analyse de l'ADN selon la technique de Southern.

Exemple 6 : Effet de la vaccination par VVhE6 et VVhE7
10 sur le développement des tumeurs induites par HPV-16.

Des groupes de rats femelles (Fisher) âgées de 4 semaines sont vaccinées par injection intradermale de
15 $5 \cdot 10^7$ ufp (dans 100 μ l) des différents virus recombinants. Ils sont soumis à une injection de rappel avec la même dose après 12 jours.

Entre le 16e et le 17e jour, ils sont éprouvés
20 avec une lignée obtenue par co-transfection dans des cellules primaires de rat : (lignée RE01).

- 1) d'un plasmide comportant le génome de HPV-16 sous contrôle du LTR de rétrovirus de Moloney (22) ;
- 2) d'un plasmide codant pour un gène de résistance à G418
25 et pour EJ-RAS, qui ne transforme que des cellules de lignées établies ou exprimant un gène immortalisant.

2×10^4 cellules sont injectées dans un volume de
30 200 μ l de tampon MEM.BME sans sérum par voie sous-cutanée.

D'après les figures 8 et 9, on fait les constatations suivantes :

35

- les animaux témoins, non vaccinés, développent des tumeurs détectables 10 jours après l'inoculation des cellules transformées (voir lignes citées).

5

- les animaux vaccinés avec VVhE6 ne développent pas de tumeur dans 2 cas sur 7 (> 100 jours). Lorsque des tumeurs apparaissent, dans 3 cas leur développement est ralenti de façon très significative et pour 2 animaux l'apparition des tumeurs est retardée (24 et 34 jours au lieu de 10 jours). Enfin, dans deux cas, le développement des tumeurs est identique à celui présenté par les animaux du lot témoin.

10

15

- les animaux vaccinés avec VVhE7 ne développent pas de tumeur dans 3 cas sur 7 (> 100 jours). Dans les 4 autres cas, les tumeurs apparaissent dès le 10e jour, mais leur développement est significativement retardé.

20

Afin de tester les effets protecteurs de ces vaccinations, les animaux qui dans les deux lots n'ont pas développé de tumeurs sont repris et éprouvés 80 jours après la première épreuve d'inoculation avec 10 fois la dose initiale, c'est-à-dire 2×10^5 cellules. Dans de telles conditions d'inoculation, des animaux témoins développent des tumeurs après 4 jours.

25

30

- les animaux qui avaient été vaccinés par VVhE6 développent des tumeurs de façon identique aux animaux témoins.

35

- par contre, les animaux préalablement vaccinés avec VVhE7 même dans ces conditions ne développent pas de tumeurs (> 100 jours).

Ces résultats ainsi que les précédents mettent en avant le rôle important que jouent les antigènes E7 dans la protection contre le développement des tumeurs induites par HPV-16.

Afin de vérifier les résultats ci-dessus deux autres séries d'expériences sont réalisées avec d'autres lignées cellulaires. Des groupes de rats femelles âgées de 4 semaines sont vaccinées par injection intradermale des virus recombinants comme décrit précédemment. Les rats vaccinés par les virus recombinants sont éprouvés avec $2 \cdot 10^4$ ou 10^5 cellules primaires (lignée RE31) de rat préparées selon le protocole décrit précédemment. Le nombre d'animaux ayant rejeté les tumeurs ou chez lesquels on observe un retard dans l'apparition de celles-ci est donné dans la première partie du tableau II (Première épreuve). Dans ce tableau VV0 correspond à un virus de la vaccine recombinant témoin n'exprimant pas une protéine de HPV). Puis, des rats ayant rejeté une première fois les tumeurs sont à nouveau éprouvés mais en utilisant une concentration supérieure de cellules primaires ($2 \cdot 10^5$ au lieu de $2 \cdot 10^4$ ou 10^5). Le résultats obtenus sont présentés dans la seconde partie du tableau II (Deuxième épreuve).

TABLEAU II

Virus	Rejet	Retard dans l'apparition de la tumeur	Total
recombinant			
<u>Première épreuve par injection de $2 \cdot 10^4$ cellules de la lignée RE31 par rat</u>			
VVhE6	3/18	5/18	8/18
VVhE7	3/17	5/17	9/17
VV0	0/17	0/17	0/17
<u>Première épreuve par injection de 10^5 cellules de la lignée RE31 par rat</u>			
VVhE6	7/20	1/20	8/20
VVhE7	5/20	0/20	5/20
VV0	1/20	0/20	1/20
<u>Deuxième épreuve par injection de $2 \cdot 10^5$ cellules de la lignée RE31 par rat</u>			
VVhE6	2/4	0/4	2/4
VVhE7	3/4	1/4	4/4
VV0	0/5	0/5	0/5

Dans une autre série d'expériences, les lignées de cellules primaires de rats, servant à éprouver les rats vaccinés, sont co-transfectées par :

1) un plasmide comportant le génome de HPV-16 sous le contrôle de son propre promoteur,

2) un plasmide codant pour un gène de résistance à G418 et pour EJ-RAS, qui ne transforme que des cellules de lignées établies ou exprimant un gène immortalisant.

On obtient ainsi la lignée RE604. Le tableau III présente les résultats obtenus dans ces conditions expérimentales.

TABLEAU III

Epreuve par injection de 2×10^4 cellules de la lignée RE604 par rat

15	Virus recombinant	Rejet	Retard dans l'apparition de la tumeur	Total
	VVhE6	0/30	6/30	6/30
20	VVhE7	7/40	10/40	17/40
	VVhE6/VVhE7	0/10	2/10	2/10
	VV0	0/30	0/30	0/30

25 Les résultats de ces expériences mettent en avant le rôle important que jouent les antigènes E7 et E6 dans la protection contre le développement des tumeurs induites par HPV-16

30 Dans toutes les lignées cellulaires, l'expression de la protéine E7 est vérifiée par immunoprécipitation. L'action protectrice exercée par l'antigène E7 n'est donc pas dépendante de la lignée considérée.

Les souches suivantes ont été déposées le 24 février 1989 à la collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur (Paris) :

- E. coli pTG2198 sous le n° I-837.
- 35 - E. coli pTG2199 sous le n° I-838.
- E. coli pTG3180 sous le n° I-839.

REFERENCES

- (1) PFISTER, H. (1987) in : The Papovaviridae : The
papillomaviruses (édition, Salzman, N.P. et Howley,
5 P.M.) Plenum Press, New York, p. 1-38.
- (2) SCHLEGEL, R. et al. (1986). SCIENCE 233, 464-467.
- (3) DANOS, O. et M. YANIV (1987). In. Cancer Cells 5 :
10 Papillomaviruses, Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, N.Y.
- (4) KANDA, T. et al. (1988). J. Virol. 62, 610-613.
- 15 (5) VOUSDEN, K. H. et al. (1988). Oncogene Res. 3, 1-9.
- (6) BEDELL, M.A. et al. (1987). J. Virol. 61, 3635
3640.
- 20 (7) Zur HAUSEN, H. et SCHNEIDER, A. (1987). in : The
Papovaviridae : The papillomaviruses (édition,
Salzman, N.P. et Howley, P.M.) Plenum Press, New
York, p. 245-263.
- 25 (8) WECK, P.K. et WHISNANT, J.K. (1987) in : The
papillomaviruses (édition, Sulzman, N.P. et Howley,
P.M.) Plenum Press, New York, p. 393-402.
- (9) SINETRUY, B. et al. (1982). EMBO J. 82, 621-628.
- 30 (10) KIENY, M.P. et al. (1983). Gene 26, 91-99.

- (11) KIENY, P.P. et al. (1984). Nature 312, 163-166.
- (12) DAVIS G. et al. (1986). Basic methods in molecular biology (Elsevier).
- 5 (13) ANDROPHY, E.J. et al. (1987) in : The Papovaviridae : The papillomaviruses (edition, Salzman, N.P. et Howley, P.M.) Plenum Press, New York, p. 79-85.
- 10 (14) SCHLEGEL, R. et WADE-GLASS, M. (1987) in : The papillomaviruses (edition, Salzman, N.P. et Howley, P.M.) Plenum Press, New York, p 87-91.
- (15) SCHILLER et al. (1984). PNAS 81, 7880.
- 15 (16) ANDROPHY, E.J. et al. (1986). Science 230, 442-445.
- (17) BURCKHARDT, A. et al. (1987). EMBO J. 6, 2381-2385.
- 20 (18) GRISONI, M. et al. (1984). Virology 135, 406-416.
- (19) LATHE, R. et al. (1987). GENE 57, 193-201.
- (20) ANDROPHY, E.J. et al. (1987). EMBO J. 6, 989-992.
- 25 (21) SHOTKIN et WETTSTEIN (1986), PNAS 83, 1689-1694.
- (22) STOREY, A. et al. (1988), EMBO J. 7, 1815-1820.

REVENDEICATIONS

1. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle
contient à titre de principe actif préventif ou
5 curatif, au moins un poxvirus recombinant qui
comporte une séquence d'ADN hétérologue codant au
moins pour la région essentielle d'une protéine
non structurale d'un papillomavirus, ainsi que les
éléments de régulation assurant son expression dans
les cellules supérieures.
10
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en
ce que les éléments de régulation assurant
l'expression de la séquence d'ADN hétérologue
15 comportent un promoteur de la transcription du gène
et une région d'initiation de la traduction dans les
cellules hôtes.
3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en
20 ce que la position -3 de la région d'initiation de la
traduction comporte un A ou un G.
4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3
caractérisée en ce que le poxvirus est vivant ou
25 tué.
5. Composition selon l'une des revendications 1 à 3
caractérisée en ce que ladite séquence d'ADN code
pour l'une au moins des protéines précoces du virus
30 HPV-16.
6. Composition selon l'une des revendications 1 à 5
caractérisée en ce que lesdites protéines précoces
sont choisies parmi E1, E2, E4, E5, E6 et E7.
35
7. Composition selon la revendication 6 caractérisée en
ce que lesdites protéines précoces sont choisies

parmi E6, E7 et E5.

8. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite protéine précoce est la protéine E7.
- 5 9. Composition selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite protéine précoce est la protéine E5 dont la séquence codante est représentée à la figure 6.
- 10 10. Composition selon l'une des revendications précédentes caractérisée en ce que les séquences d'ADN codant pour les protéines précoces d'un papillomavirus sont sous le contrôle d'un promoteur d'un gène du poxvirus utilisé.
- 15 11. Composition selon la revendication 10 caractérisée en ce que le poxvirus est le virus de la vaccine.
12. Composition selon la revendication 10 caractérisée en ce que le promoteur est le promoteur du gène de la protéine 7,5 K du virus de la vaccine.
- 20 13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12 caractérisée en ce que les séquences d'ADN codant pour les protéines précoces d'un papillomavirus sont clonées à l'intérieur d'une région non essentielle du virus utilisé.
- 25 14. Composition selon la revendication 13 caractérisée en ce que la région non essentielle est le gène TK.
- 30 15. Composition selon l'une des revendications 1 à 14 caractérisée en ce qu'elle comporte un support pharmaceutiquement acceptable permettant son administration par injection à l'homme ou à l'animal.
- 35

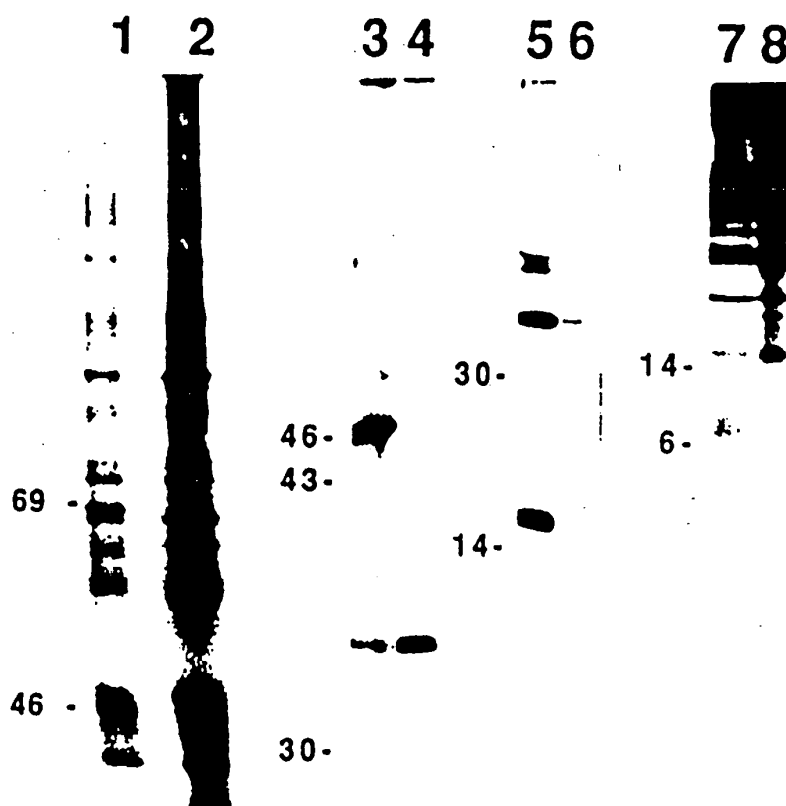
FIG. 1

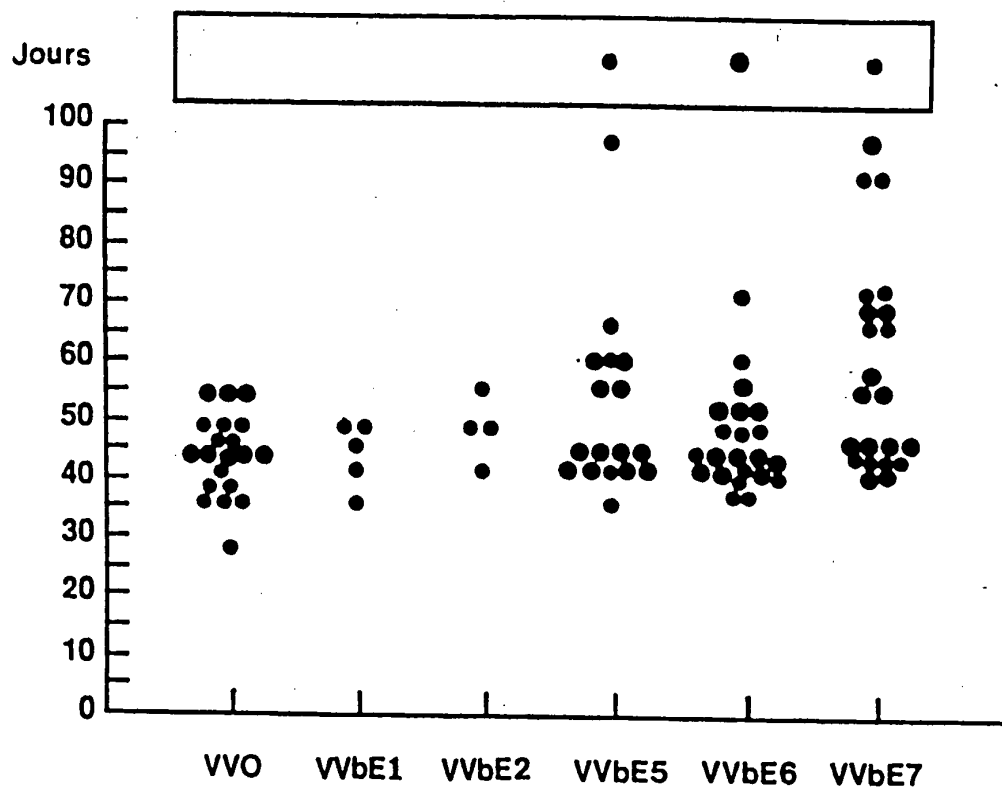
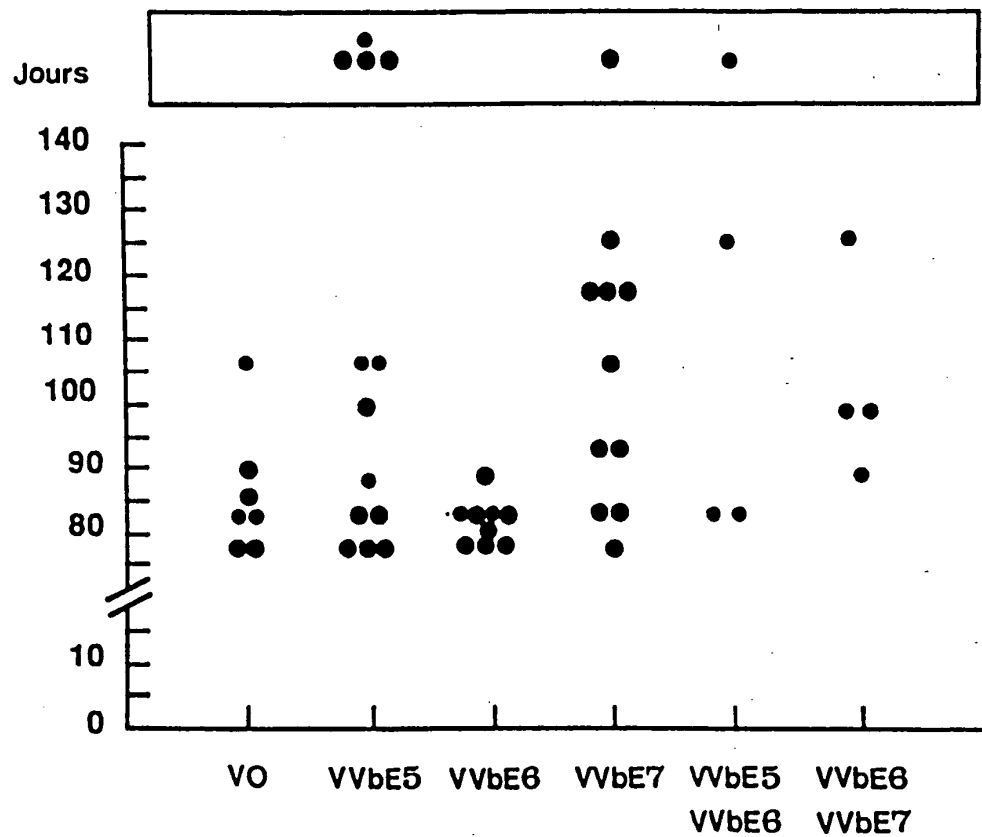
FIG. 2

FIG. 3

FEUILLE DE REMPLACEMENT

Fig. 4

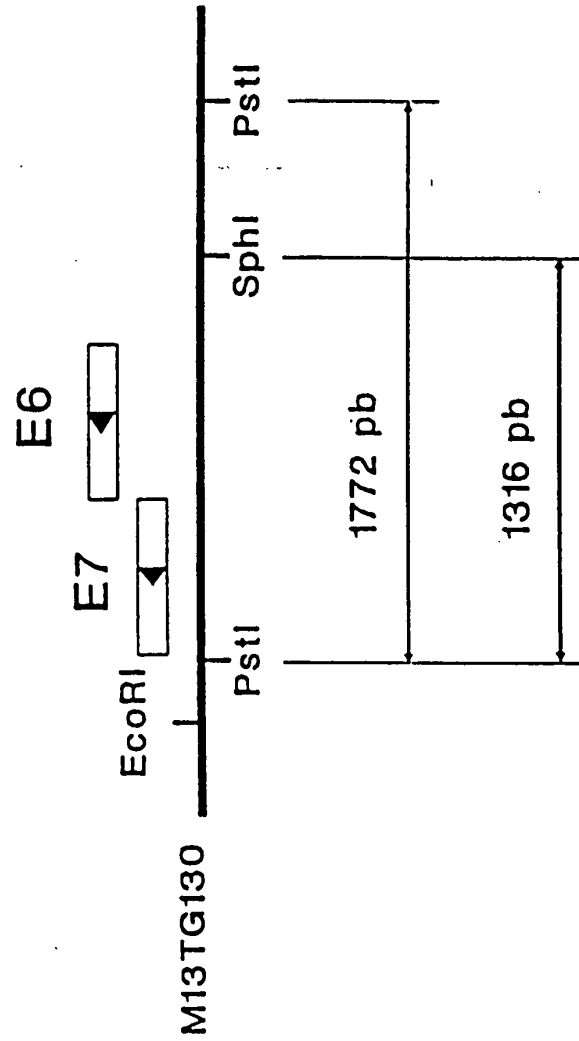


Fig. 5

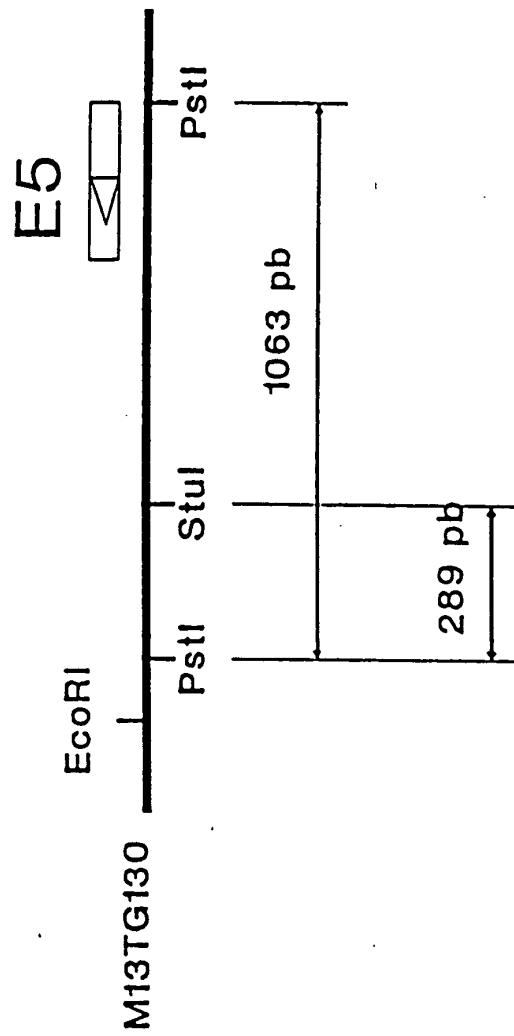


FIG. 6

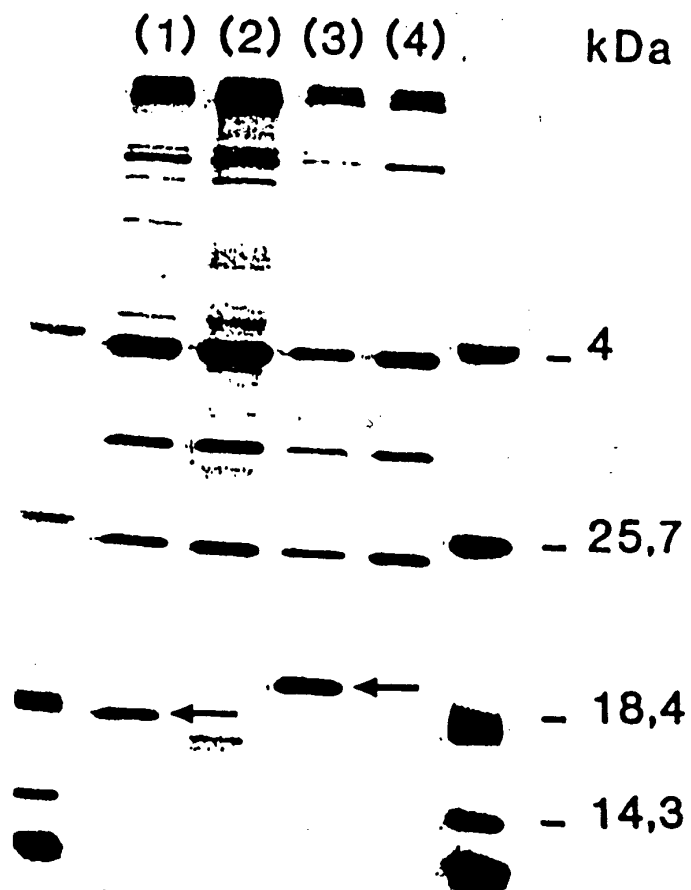
ATGACAAATCTTGATACTGCATCCACAACAT TACTGGCGTGCTTTT TGCT
1 50

TTGCTTTTGTGTGCTTTTGTGTGCTGCCAT TAATACGTCGCTGCTTT
100

TGTCTGTGTCTACATACACATCAT TAATACTATTGGTATTACTATTGTGG
150

ATAACAGCAGCCTCTGCGTTTAGGTGTTTAT TGTATATAT TGTATTGT
200

TTATATACCAT TATTTTAAATACATACATGCACGCTTTTAAAT TACATAA
250

FIG. 7

8/9

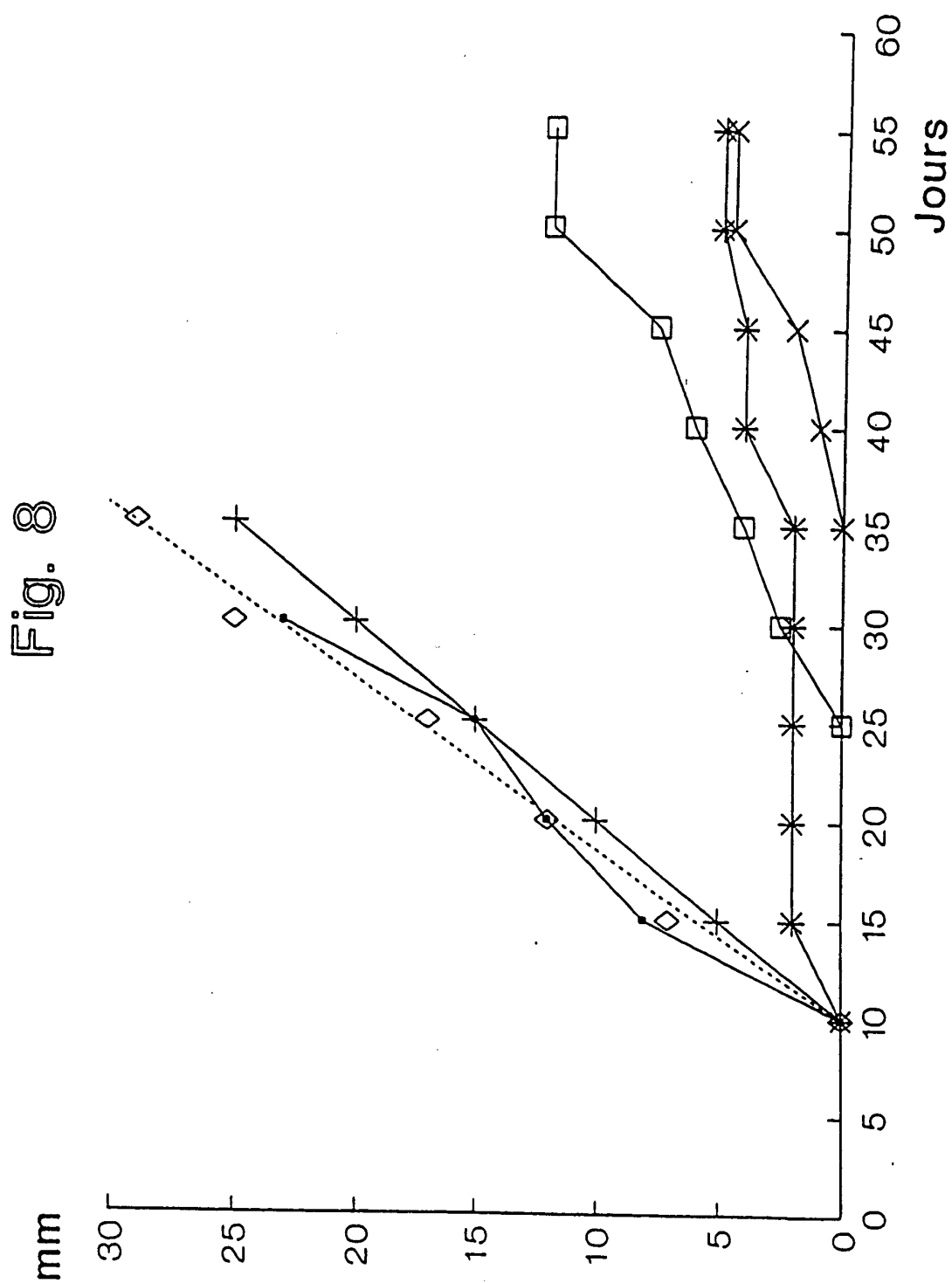
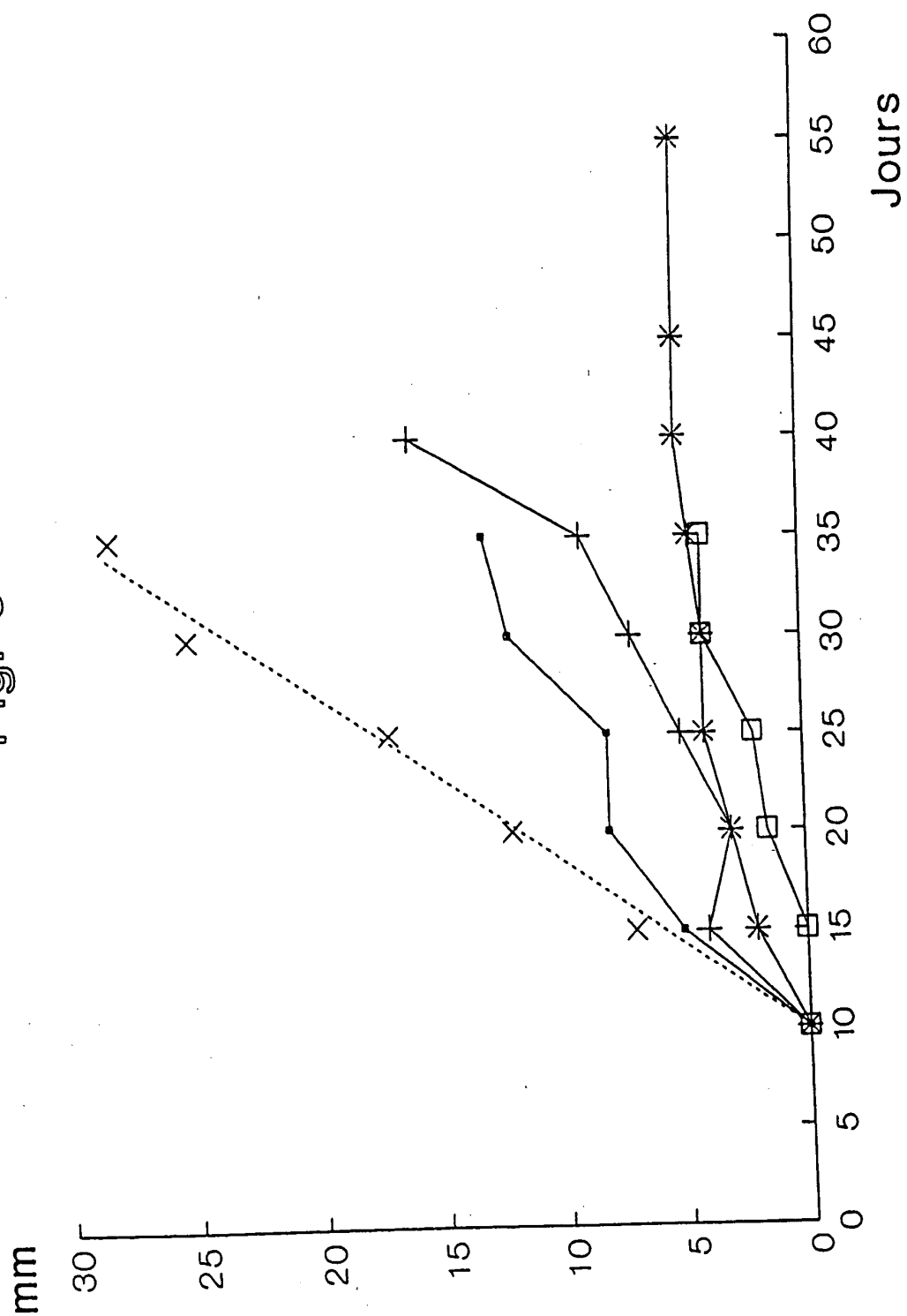


Fig. 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/FR 90/00151

I. CLASSIFICATION F SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶ According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC Int.Cl. ⁵ A 61 K 39/12, 39/285, //C 12N 15/37, C 12 N 15/86											
II. FIELDS SEARCHED <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Minimum Documentation Searched ⁷</div> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <th style="width: 25%; border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification System</th> <th style="border: 1px solid black; padding: 5px;">Classification Symbols</th> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 10px; vertical-align: top;">Int.Cl.⁵</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 10px; vertical-align: top;">C 12 N, C 12 P</td> </tr> </table> <div style="text-align: center; border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black; margin: 5px 0;">Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸</div>			Classification System	Classification Symbols	Int.Cl. ⁵	C 12 N, C 12 P					
Classification System	Classification Symbols										
Int.Cl. ⁵	C 12 N, C 12 P										
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹ <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category ⁹</th> <th style="width: 60%; padding: 5px;">Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²</th> <th style="width: 30%; padding: 5px;">Relevant to Claim No. ¹³</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">The Journal of General Virology, vol. 69, No. 6, June 1988 (SGM, GB) H.M. Browne et al.: "Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant" pages 1263-1273, see page 1266</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-8,10-14</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">Y</td> <td style="padding: 10px;">The Embo Journal, vol. 7, No. 6, June 1988, IRL PRESS Ltd (Oxford, GB) A. Storey et al.: "Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types" pages 1815-1820, see the whole article in particular figure 1 (cited in the application)</td> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 10px;">1-8,10-14</td> </tr> </tbody> </table>			Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³	Y	The Journal of General Virology, vol. 69, No. 6, June 1988 (SGM, GB) H.M. Browne et al.: "Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant" pages 1263-1273, see page 1266	1-8,10-14	Y	The Embo Journal, vol. 7, No. 6, June 1988, IRL PRESS Ltd (Oxford, GB) A. Storey et al.: "Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types" pages 1815-1820, see the whole article in particular figure 1 (cited in the application)	1-8,10-14
Category ⁹	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³									
Y	The Journal of General Virology, vol. 69, No. 6, June 1988 (SGM, GB) H.M. Browne et al.: "Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vaccinia virus recombinant" pages 1263-1273, see page 1266	1-8,10-14									
Y	The Embo Journal, vol. 7, No. 6, June 1988, IRL PRESS Ltd (Oxford, GB) A. Storey et al.: "Comparison of the in vitro transforming activities of human papillomavirus types" pages 1815-1820, see the whole article in particular figure 1 (cited in the application)	1-8,10-14									
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>⁹ Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"A" document member of the same patent family</p> </div> </div>											
IV. CERTIFICATION <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 July 1990 (03.07.90)</div> </td> <td style="width: 50%; border: 1px solid black; padding: 5px;"> Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">03 August 1990 (03.08.90)</div> </td> </tr> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">European Patent Office</div> </td> <td style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> Signature of Authorized Officer </td> </tr> </table>			Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 July 1990 (03.07.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">03 August 1990 (03.08.90)</div>	International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer					
Date of the Actual Completion of the International Search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">3 July 1990 (03.07.90)</div>	Date of Mailing of this International Search Report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">03 August 1990 (03.08.90)</div>										
International Searching Authority <div style="text-align: center; font-weight: bold;">European Patent Office</div>	Signature of Authorized Officer										

MICRO-ORGANISMES

Feuille (à compléter) relative au micro-organisme mentionné en page 24, ligne 35 de la description 1

A. IDENTIFICATION DU DÉPÔT :

D'autres dépôts sont identifiés sur une feuille supplémentaire ☒

Nom de l'institution de dépôt :

INSTITUT PASTEUR
Collection Nationale de Cultures de Microorganismes

Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) :

25 rue du Docteur Roux
75724 PARIS CEDEX 15
FRANCE

Date du dépôt :

24 FEVRIER 1989

N° d'ordre :

I-838

B. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES : (à ne remplir que si nécessaire). Une feuille séparée est jointe pour la suite de ces renseignements ☐

C. ÉTATS DESIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES : (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)

D. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT : (à ne remplir que si nécessaire)

Les indications énumérées ci-après seront soumises ultérieurement au Bureau International (spécifier la nature générale des indications p. ex., «No d'ordre du dépôt»)

E. ☐ La présente feuille a été reçue avec la demande internationale lorsque celle-ci a été déposée (à vérifier par :

(Fonctionnaire autorisé)

☐ Date de réception (en provenance du déposant) par le Bureau International 1^{er}

07 MAY 1990

1 07. 05. 90

(Fonctionnaire autorisé)

THIS PAGE BLANK (uspto)

III. DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICQUÉS SUR LA DEUXIÈME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, des passages pertinents	N° des revendications visées
A	<p>Nature, vol. 326, 30 avril 1987, R. Lathe et al.: "Tumour prevention and rejection with recombinant vaccinia", pages 878-880, voir l'article en entier</p> <p>--</p>	1-4, 10-15
P,X	<p>Journal of Cellular Biochemistry, Suppl. 13C, 1989, UCLA Symposia on Molecular & Cellular Biology Symposium Papillomaviruses held from March, 11-18, 1989 G. Meneguzzi et al.: "Vaccination against papillomavirus-induced tumors using Vaccinia recombinants expressing non-structural proteins" voir page 210, résumé 1223</p> <p>-----</p>	1-15

THIS PAGE BLANK (USPTO)